






## Gene preparations

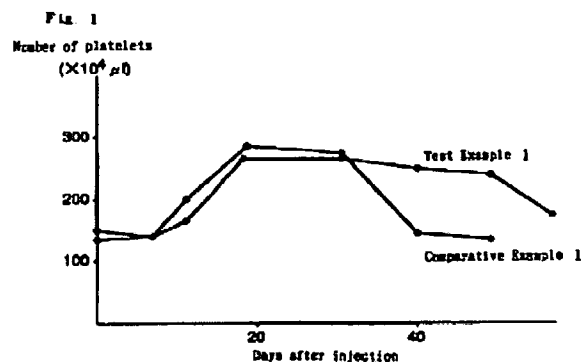
**Patent number:** CN1193916  
**Publication date:** 1998-09-23  
**Inventor:** MASAAKI TERADA (JP); TAKAHIRO OCHIYA (JP);  
TERUO MIYATA (JP)  
**Applicant:** KOKEN KK (JP)  
**Classification:**  
- **International:** **A61K48/00; A61K48/00; (IPC1-7): A61K48/00;**  
A61K9/127; A61K31/70; A61K35/76; A61K47/02;  
A61K47/32; A61K47/34; A61K47/36; A61K47/42  
- **European:** A61K48/00  
**Application number:** CN19960196463 19960702  
**Priority number(s):** JP19950167744 19950703

**Also published as:**

 EP0844004 (A1)  
 WO9702047 (A1)  
 EP0844004 (A4)  
 CN1230205C (C)  
 AU704694B (B2)

Report a data error here

Abstract not available for CN1193916  
Abstract of corresponding document: **EP0844004**  
Gene preparations comprising desired genes or  
vectors containing desired genes integrated  
thereinto and carriers for supporting the same.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 96196463.4

A61K 48/00

A61K 9/127

A61K 31/70

A61K 35/76

A61K 47/02

A61K 47/32

A61K 47/34

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1230205C

[22] 申请日 1996.7.2 [21] 申请号 96196463.4

[30] 优先权

[32] 1995.7.3 [33] JP [31] 167744/95

[86] 国际申请 PCT/JP1996/001824 1996.7.2

[87] 国际公布 WO1997/002047 日 1997.1.23

[85] 进入国家阶段日期 1998.2.23

[71] 专利权人 株式会社高研

地址 日本东京都

共同专利权人 住友制药株式会社

[72] 发明人 寺田雅昭 落谷孝广 宫田晖夫

伊藤博

审查员 孙广秀

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 孟八一 谭明胜

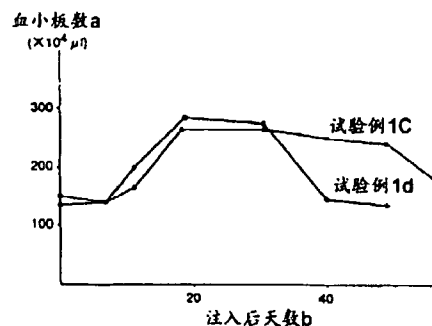
A61K 47/36 A61K 47/42

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 4 页

[54] 发明名称 基因制剂

[57] 摘要

基因制剂, 包含所需基因或含整合于其上的所需基因的载体, 并含支撑该基因的载体。



ISSN 1008-4274

1. 一种含有所需基因的基因制剂，其中将所述基因或插入了所述基因的载体混合进由不全胶原制成的载体中。
- 5 2. 如权利要求 1 的基因制剂，其中当所述基因制剂被用于活体内时，所述不全胶原在该基因制剂中的含量为 0.01 - 25 w/w%。
3. 如权利要求 1 的基因制剂，其为溶液、悬浮液、含水凝胶、薄膜、海绵状物、棒状物或球形形式。
4. 如权利要求 1 的基因制剂，其中所述载体选自病毒载体、脂质
- 10 体载体、融合脂质体载体，所述融合载体中融合了病毒和脂质体。
5. 如权利要求 1 的基因制剂，其中所述载体是病毒载体。
6. 如权利要求 1 的基因制剂，其中所述载体是腺病毒载体。
7. 如权利要求 1-6 中任一项的基因制剂，其还含有添加剂。
8. 如权利要求 7 的基因制剂，其中所述添加剂选自蔗糖、甘氨酸、
- 15 硫酸软骨素、明胶、白蛋白、氯喹和聚赖氨酸。
9. 如权利要求 7 或 8 的基因制剂，其中所述添加剂的量为所述不全胶原的 5-900 w/w%。

## 基因制剂

## 发明领域

- 5 本发明涉及药物领域，特别是基因治疗领域。更具体地讲，本发明涉及一种含有基因的制剂。在施用于活体以后，该制剂可稳定地保持基因载体或基因，将其逐渐释出并在长时期内维持治疗效果。该制剂可以在有利时间内中止治疗。

## 发明背景

- 10 基因治疗是一个活跃的研究领域，而且对成功治疗方法的期望极高。在基因本身作为药品的基因疗法中，对疾病的治疗是通过将选定的酶、细胞因子之类的基因转移到患者的细胞内而进行的。然后所导入的基因在患者体内产生特定物质。这种基因疗法可分成两类。第一类的用意是通过将特定基因整合到患者的基因组内而对该基因进行半永久性表  
15 达。另一类的用意是瞬时表达一种基因而不期望该基因整合到基因组中。在后一种类型的基因疗法中，通常将利用腺病毒之类的方法，来将编码能增强抗癌细胞的抗癌免疫力的细胞因子之类的基因转移到患者体内（ Cardiovascular Research, 28,445 ( 1994 ) ; Science, 256,808 ( 1992 ) ; Gastroenterology, 106,1076 ( 1994 ) ; TIBTECH, 11,182 ( 1993 ) ; J.Biol.Chem., 266,3361 ( 1991 ) ; Nature Medicine, 1,583 ( 1995 ) ; 并将其收作参考文献）。

在利用病毒载体的情况下，尽管基因转移的效率通常很高，但由于免疫反应而使反复施药变得很困难（ J.Biol.Chem., 269,13695 ( 1994 ) , Am.J.Respir.Cell Mol., 10,369 ( 1994 ) ）。

- 25 在 J.Controlled Release 33,307-315 ( 1995 ) 等文献中披露了一种用胶原来逐步释放含有有机化合物或蛋白制剂的药物之制剂。不过，当所披露的和常见的药物（例如，蛋白类药物、化学合成的药物等）保持在胶原凝胶等物质中时，它会在大约 1 - 2 天内溶解。

- 30 在一种目前被用于基因治疗的方法中，包括施用一种基因载体（插入了基因的载体）或直接用基因，该基因载体或基因在施用后马上接触细胞，并在基因转移开始和结束后马上开始。另外，转导到细胞中的基因随着细胞分裂而被稀释（即：其拷贝数减少），或是通过在细胞中降

解而减少。因此，转移基因的表达仅能维持几周时间，这段时间对于实施充分治疗来说太短了，这是该方法的缺陷之一。因此，必需反复施用一种基因载体或基因。因而本发明的一个目的是克服上述缺陷，并提供一种能逐步释放一种基因载体或基因，并可以将治疗效果维持很长时间的制剂。

另外，希望一种能够反复施用的方法，因为这类方法在利用病毒载体之类的基因治疗中是难于实施的。因此，本发明的第二个目的是提供一种能够在利用病毒载体之类的基因治疗中反复施用的基因制剂。

另外，希望基因在体内的表达能被随时中止，以确保安全，因为基因能表达几周时间这长于蛋白制剂的有效期。因此，本发明的第三个目的是提供一种基因制剂，当希望中止治疗时，该制剂能够迅速中止基因转移。

#### 发明概述

本发明人且已检验了各种制剂逐步释放基因载体或基因的能力，并且已发现，当这样一种制剂—其中，一种基因或插入了基因的载体被混入一种由生物相容性材料制成的载体中—被用于活体内时，该基因出乎预料的可表达很多个月的时间。本发明人还发现，该制剂可以反复用于活体内，并由此完成了本发明。

因此，本发明具有以下特征。

(1)一种含有基因的基因制剂，其中，将所述基因或插入了该基因的载体混入一种由生物相容性材料制成的载体中。

(2)如(1)所述的基因制剂，其中，所述生物相容性材料选自胶原、明胶、血纤蛋白、白蛋白、透明质酸、肝素、硫酸软骨素、壳多糖、乙酰壳多糖、藻酸、果胶、琼脂糖、羟基磷灰石、聚丙烯、聚乙烯、聚二甲基硅氧烷，乙醇酸、乳酸或氨基酸的聚合物或共聚物，上述生物相容性材料中至少两种的混合物。

(3)一种含有基因的基因制剂，其中，所述基因或插入了该基因的载体被混入由含有胶原的生物相容性材料制成的载体中。

(4)一种含有基因的基因制剂，其中，所述基因或插入了该基因的载体被混入由胶原制成的载体中。

(5)如上述(1)的基因制剂，其中，当用于活体内时，所述基因制剂中生物相容性材料的含量为 0.01 - 30w/w %。

(6)如上述(1)的基因制剂, 其为溶液、悬浮液、含水凝胶、薄膜、海绵状物、棒状或球状形式。

(7)如上述(1)的基因制剂, 其中, 所述载体选自病毒载体、脂质体载体和融合脂质体载体, 该融合脂质体载体融合了一种病毒和一种脂质体。

(8)如上述(1)的基因制剂, 其中, 所述载体是病毒载体。

(9)如上述(1)的基因制剂, 其中, 所述载体是一种腺病毒载体。

(10)一种含有基因的基因制剂, 其中, 将所述基因或插入了该基因的载体混入由生物相容性材料制成的载体中, 此载体材料装在容器中, 所述基因载体或基因可透过该容器。

#### 附图简介

图1表示试验例1和比较例1中血小板数的时程曲线。

图2表示试验例1和比较例1的外周血中的HST-1时程曲线。

图3表示试验例4和比较例1中血小板数的时程曲线。

图4是试验例5中血小板数的时程曲线。

图5表示试验例6中胶原对外周血中HST-1数的剂量依赖性。

图6表示试验例7和比较例2中血小板数的时程曲线。

#### 发明详述

下面将对本发明做更详细地说明。

“用于基因插入的载体”可以是任何可将基因转移到细胞中的任何载体, 例如, 可包括病毒载体、脂质体载体、融合脂质体等, 该融合脂质体中融合了一种病毒和脂质体 (Cardiovascular Research, 28,445 (1994); Science, 256,808 (1992); Gastroenterology, 106,1076 (1994); TIBTECH, 11,182 (1993); J.Biol.Chem., 266,3361 (1991); Nature Medicine, 1,583 (1995); 这些文献被收作本文参考资料)。

病毒载体可以是任何能在基因治疗中作为普通载体使用的载体, 例如, 包括腺病毒、腺共生病毒、牛痘病毒、逆转录病毒、HIV病毒或疱疹病毒等。可以用常规方法, 例如, 披露于上述参考文献中的方法, 直接将用于转移的基因插入病毒载体中而获得所述基因载体。

脂质体载体可以是任何能在基因治疗中作为普通脂质体载体使用的载体, 例如, 包括通过混合DOTMA、DOPE、DOGS等而获得的脂质

载体。当采用阳离子型脂质体载体时，向细胞中转移的效率很高。其中融合了病毒和脂质体的融合脂质体载体的例子，包括融合了仙台病毒（HVJ：日本血凝病毒）和脂质体的融合脂质体病毒等。可以用常规方法，例如，披露于上述文献中的方法，将用于转移的基因包装于脂质体载体或融合脂质体中而获得基因载体。被包装的基因可以是任何能在活体内表达该基因的形式，优选在活体内稳定的形式，如质粒等。

可将基因本身保持在本发明的基因制剂中，而不必插入能将基因转入细胞的“用于基因插入的载体”中。在这种情况下，基因的形式可以是能在活体内表达该基因的任何形式。例如，可将基因插入被称作表达载体之类的物质中。基因的形式优选在活体内稳定的形式，如质粒等。

用于转移的“基因”可以是能用于基因治疗的任何基因，例如，包括腺苷脱氨酶基因、GM-CSF基因、胸苷激酶基因等。

“生物相容性材料”优选具有高生物相容性并可将基因或基因载体稳定保持在活体内的材料。生物相容性材料的例子包括胶原、明胶、血纤蛋白、白蛋白、透明质酸、肝素、硫酸软骨素、壳多糖、乙酰壳多糖、藻酸、果胶、琼脂糖、羟基磷灰石、聚丙烯、聚乙烯、聚二甲基硅氧烷、乙醇酸、乳酸或氨基酸的聚合物或共聚物，两种或两种以上上述材料的混合物等。特别优选的生物相容性材料是胶原。也优选将胶原与上述其它生物相容性材料混合。胶原可以是任何胶原，例如，包括可溶于酸的胶原、可由酶溶解的胶原[如不全胶原（atelocollagen）等]、可由碱溶解的胶原、具有修饰的氨基酸侧链的胶原、桥连胶原、通过遗传工程产生的胶原等。而具有修饰的氨基酸侧链的胶原例如包括，丁二酰基或甲基胶原等。桥连胶原例如包括用戊二醛、1,6-己二异氰酸酯或聚环氧化合物等处理过的胶原（Fragrance J., 1989-12, 104-109，日本专利（审查过的公开号 No.7（1995）-59522））。

可视需要将“添加剂”加入本发明的制剂中，以稳定基因载体等，加速基因向细胞或细胞核中的转移或调节基因载体等的释出。添加剂可以是能实现上述目的的任何添加剂，例如，包括蔗糖、甘氨酸、硫酸软骨素、明胶、白蛋白、细胞因子、高迁移率族蛋白 HMG-1 和 HMG-2 的混合物（High Mobility Group-1, -2 Mixture；Experimental Medicine, 12, 184（1994），BIOTHERAPY, 8, 1265（1994））、氯喹、聚赖氨酸（Hepatology, 22, 847（1995））、Transfectam（商

标, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 等。

在胶原与其它生物相容性材料或添加剂混合的情况下, 胶原含量可以至少为 10w/w %, 优选至少 30w/w %、至少约 50w/w % 更好, 至少 70w/w % 最好。

- 5        所述基因制剂中生物相容性材料的含量因基因载体或基因的大小和种类等, 以及生物相容性材料的种类等而异。

在基因制剂被用于活体的条件下, 该基因制剂中生物相容性材料的优选含量为 0.01 - 30w/w %, 0.05 - 10w/w % 更好, 0.05 - 5w/w % 最好。

- 10       另外, 基因制剂中生物相容性材料的含量因具体制剂而异。例如, 在胶原被用作生物相容性材料的条件下, 其优选含量范围将在下文介绍。

- 15       当该制剂为凝胶形式时, 胶原的优选含量为 0.01 - 25w/w %, 0.05 - 10w/w % 更好, 0.05 - 5w/w % 最好。不过, 当胶原含量为 2 % 或更高时, 优选以占胶原 5 - 900w/w % 的量加入添加剂。

当该制剂为薄膜形式时, 胶原的优选含量为 0.2 - 30w/w % (为干燥之前的含量)、0.3 - 5w/w % 更好, 0.4 - 2w/w % 最好。不过, 当胶原含量为 1 % 或更高时, 优选以占胶原 5 - 900w/w % 的量加入添加剂。

- 20       当该制剂为固体棒条形式时, 胶原的含量优选为 10 - 30w/w %, 而且, 最好以占胶原 5 - 100w/w % 的量加入添加剂。

- 25       本发明的基因制剂并不局限于特定形式。该制剂可以为溶液、悬浮液、含水凝胶、薄膜或海绵状物。固体形式可以成形为棒条、球形等。不过, 优选形式一般为溶液、悬浮液或含水凝胶, 尽管该制剂的形式因用于基因插入的载体的种类、大小等而异。

基因制剂是通过将上述基因制剂中生物相容性材料的含量, 在该基因制剂被用于活体的条件下, 在该基因制剂中维持于上述优选范围内而获得。

- 30       生产溶液、悬浮液或含水凝胶形式的基因制剂的方法的例子包括(1)将基因载体或基因(以下称基因载体等)的粉状物、溶液、悬浮液或凝胶与溶液或凝胶形式的载体混合, 视需要向该载体中加入添加剂的方法, (2)使基因载体等的溶液、悬浮液或凝胶, 渗入粉末状的载体中, 视



需要向该载体中加入添加剂的方法，或(3)使基因载体等的溶液、悬浮液或凝胶渗入海绵状物的载体中，视需要向其中添加添加剂，并将其捏和在一起的方法。但用于制备本发明基因制剂的方法并不局限于上述方法。

- 5        用于制备固体形式的基因制剂的方法的例子包括(1)将基因载体等的粉状物、溶液、悬浮液或凝胶与溶液或凝胶形式的载体混合，视需要向其中加入一种添加剂并干燥该混合物的方法，(2)将基因载体等的粉状物、溶液、悬浮液或凝胶与粉末状的载体混合，视需要向其中加入一种添加剂并干燥该混合物的方法，(3)使基因载体等的溶液、悬浮液或凝胶
- 10    渗入海绵状形式的载体中，视需要向其中加入添加剂并干燥该海绵状物的方法，(4)使基因载体等的悬浮液或凝胶渗入海绵状物的载体中，视需要向其中加入添加剂，并在静止或捏和条件下干燥该海绵状物，以及视需要加水等之后干燥该海绵状物的方法，(5)压碎并加压模制用(1)至(4)的方法获得的固体产品的方法，或(6)将基因载体等的粉状与粉状载体混
- 15    合，视需要向其中加入添加剂，并加压模制该混合物的方法。但本发明并不限于上述方法。干燥方法；干燥温度和湿度；混合方法；混合温度和湿度；加压模制方法；加压模制时的湿度和压力；载体溶液和基因载体溶液的溶解速度；以及载体和基因载体溶液混合物的溶解速度；以及pH值可与常规方法相同。

- 20        可以根据接受治疗的疾病、靶器官等用各种方法施用本发明的基因制剂。例如，可以通过皮下或静脉内注射施用本发明的基因制剂，或者直接用于病变的靶位点，如肾、肝、肺、脑等。直接用于病变位点能够进行器官选择性治疗。

- 25        根据本发明，当把可生物降解的材料用作生物相容性材料时，无需在施用后将该生物相容性材料从体内取出。另外，还可以反复给药。

- 30        另一方面，当根据疾病种类或症状需要进行不连续基因转移时，可按照实际情况将基因制剂取出，可以中止基因转移。例如，当基因制剂是固体时，可通过手术等将其取出。当基因治疗使用将基因载体等保持在有孔的容器之类中（病毒可以顺利通过该孔），的基因制剂进行时可在治疗结束后将所述容器等取出。例如，可以用披露于日本专利申请号3（1991）-120115（国际公开号WO92/20400）中的容器（试管）进行基因治疗。

本发明的基因制剂可以逐步释放基因载体等，同时能在持续释放期间将插入了基因的载体稳定保持在活体内。因此，通过延迟细胞与载体之间接触的方式控制基因转入细胞的时间，从而延迟长一次给药后的有效基因表达时间。

- 5 本发明的基因制剂还能够反复施用病毒载体之类的基因载体，否则，由于患者体内中和抗体的出现，而使反复给药变得难于进行。

另外，本发明的基因制剂能够调节基因表达，因为当希望中止治疗时可以将该基因制剂取出。

#### 实施例

##### 10 例 1

将 0.9ml 含有  $10^9$  pfu (噬斑形成单位) 插入了编码成纤维细胞生长因子 HST - 1 ( FGF4 ) 的基因 (按照披露于 Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84,2980-2984 ( 1987 ) 中的方法制备) 的腺病毒 ( Adex1 HST - 1 ; Proe.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.91,12368 ( 1994 ) ) 的培养基与 0.1ml

- 15 不全胶原的中性溶液 (由 KOKEN 制备的发育不全胶原植入物: 2 % 不全胶原溶液) 混合制备一种基因制剂。上述腺病毒 ( Adex1 HST - 1 ) 可以按照披露于 J.Virol., 54,711-719 ( 1985 ) 或 Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93,1320 ( 1996 ) 和 Cell, 13,181-188 ( 1978 ) 中的方法，通过缺失 5 型腺病毒 ( ATCC 目录号 VR - 5 ) 的  
20 E1A、E1B 和 E3 部份，将成纤维细胞生长因子 HST - 1 基因插入非增殖型腺病毒基因中而获得。

##### 例 2

- 将 0.1ml 2 % 不全胶原中性溶液与 0.9ml 含有  $10^9$  pfu Adex1 HST - 1 的培养基混合，制备一种凝胶型基因制剂，然后将该混合物保持在 37 °C  
25 。

##### 例 3

- 通过以下方法制成一种基因制剂：冷冻干燥不全胶原中性溶液，获得海绵状物；将该海绵状物切成约 5mm 的方块；将该切割过的海绵状物加入到 1ml 含  $10^9$  pfu Adex1 HST - 1 的培养基中，该海绵状物静止过  
30 夜。

##### 例 4

将例 2 中制备的凝胶形式的基因进行冷冻干燥制备一种基因制剂。

## 例 5

同样将例 3 中获得的基因制剂进行冷冻干燥, 并将该冻干的海绵状物压制成棒状, 再制备出丸状(即棒状物的压制品)基因制剂。

## 例 6

- 5 将一种质粒载体与一种脂质体(DMRIE - C (由 GIBCO - BRL 生产))混合, 然后再将含有该脂质体的溶液与相同体积的不全胶原的中性溶液混合, 制备一种基因制剂。所述质粒载体是将成纤维细胞生长因子 HST - 1 (FGF4) 插入具有巨细胞病毒(CMV)启动子的表达载体(pRc/CMV)中而获得的。

## 10 例 7

以如下方式制备一种颗粒形式的基因制剂: 将 1ml 含有  $10^9$ pfu 的 Adex1 HST - 1 的培养基与 1ml 1% 藻酸溶液混合; 通过一个喷头, 将所述含有载体的藻酸溶液滴加到 0.5% 的  $\text{CaCl}_2$  溶液中, 以获得直径为 1mm 的颗粒; 并通过离心收集上述颗粒。

## 15 例 8

以如下方式制备一种颗粒形式的基因制剂: 将 1ml 含有  $10^9$ pfu 的 Adex1 HST - 1 的培养基与 1ml 被加热至 45℃ 的 5% 琼脂糖凝胶混合; 通过一个喷头将该混合液滴加到温度为 10℃ 的磷酸盐缓冲液中; 离心收集所述颗粒。

## 20 例 9

将例 1 中所得到的基因制剂封装在聚酯制成的袋(由合成血管制成, 商标为 Micron, 由 INTERVASCULAR 生产)中而制备一种基因制剂。

## 例 10

- 25 与例 1 相同, 将含有  $10^9$ pfu Adex1 HST - 1 的培养基与不全胶原中性溶液混合制成 1ml 基因制剂, 使之在不全胶原的终浓度中占 0.1、0.2、0.4、1.0 或 2.0w/w%。

## 例 11

- 30 用以下方法制备一种凝胶形式的基因制剂: 将 5ml 含有浓度为 73.25  $\mu\text{g/ml}$  的质粒 pOG44 (购自 Stratagene) 的水溶液与 5g 不全胶原酸性溶液(含有 2% 发育不全胶原, PH3.5)混合; 将该混合物进行冷冻干燥, 得到海绵状物; 该海绵状物中加入蒸馏水, 使之在不全胶原的浓度中占 0.4、2、5、10 或 20w/w%。

## 例 12

用以下方法制备一种凝胶形式的基因制剂：将 5ml 含有浓度为 73.25  $\mu\text{g/ml}$  的质粒 pOG44 的水溶液与 5g 或 2.5g 不全胶原酸性溶液混合；将 260 $\mu\text{l}$  或 640 $\mu\text{l}$  人血清白蛋白水溶液（80mg/ml）加入该混合物中并混合；将该混合物进行冷冻干燥，以得到海绵状物；向该海绵状物中加入蒸馏水，使之在全胶原和人血清白蛋白的总浓度中占 10w/w %。

## 例 13

将例 11 中得到的凝胶状基因制剂展布在玻璃上并使之逐步干燥，制成一种薄膜形式的基因制剂。

## 例 14

将例 11 或 12 中获得的凝胶形式的基因制剂挤压模制和逐步干燥以制备一种棒状形式的基因制剂。

## 比较例 1

通过腹膜内给药给小鼠施用 1ml 含有  $10^9$  pfu Adex HST - 1 的培养基。然后，大约在用药后第 12 天，其血小板数增加约两倍，而且，这种效果持续到第 20 - 30 天。另外，在用药后第 20 天，外周血液中 HST - 1 的浓度达到最大值，为 50ng/ml。不过，与下面例 1 的制剂不同，HST - 1 的浓度不能保持在一个固定水平上，而且在用药后第 60 天，血液中检测不到 HST - 1。上述结果如图 1 和 2 所示。

## 试验例 1

通过腹膜内给药给小鼠施用 1ml 例 1 中制成的基因制剂。在用药后大约 12 天时，血小板数增加大约 2 倍，而且，这一效果持续到第 50 天以后。另外，在用药 80 天以后外周血液中 HST - 1 的浓度仍维持在 20ng/ml。上述结果如图 1 和 2 所示。

## 试验例 2

通过腹膜内给药给小鼠施用 1.0ml 例 2 中制备的基因制剂。在用药后大约第 12 天，其血小板数约增加 2 倍，而且，这一效果持续到用药后第 60 天以后。

## 30 试验例 3

通过腹膜内给药给小鼠施用一种例 3 中制成的基因制剂。在用药后约第 12 天，其血小板数约增加 2 倍，而且，这一效果持续到用药后第 60

天以后。

#### 试验例 4

通过腹膜内给药给小鼠施用例 1 中制备的基因制剂,并在用药后第 3 天将该基因制剂取出。结果,在用药后约第 12 天,其血小板数达双倍,然后,在用药后约第 25 天,其血小板数减少,并恢复到正常水平。上述结果如图 3 所示。

#### 试验例 5

通过腹膜内给药给小鼠施用例 1 制备的基因制剂,然后在用药后第 3 天将该基因制剂取出。在用药后第 20 天,再次施用例 1 中制备的基因制剂。结果,在用药后大约第 12 天,其血小板数约达双倍,在用药后约第 20 天,其血小板数减少并恢复到正常水平。在二次给药后其血小板数马上又增加约 2 倍,而且,这一效果能持续到第一次用药后第 40 天之后。上述结果如图 4 所示。

#### 试验例 6

通过腹膜内给药给小鼠施用例 10 中制备的各 5 基因制剂,或 1ml 含有  $10^9$  pfu Adex HST - 1 但完全不含胶原的培养基。在用药后第 5 天,测外周血液中 HST - 1 蛋白的浓度。上述结果如图 5 所示。上述数据表明, HST - 1 蛋白的血清浓度随着所述制剂中胶原浓度的增加而减少。

#### 试验例 7

通过腹膜内给药给小鼠施用 1ml 含有  $10^9$  pfu Adex HST - 1 的培养基,结果在用药后第 12 天,其血小板数达约 2 倍,然后,在用药后第 35 天左右,其血小板数减少并恢复到正常水平。在第一次用药后第 37 天,再次施用 1ml 例 1 中制备的含有不全胶原的基因制剂。此后,其血小板数马上增加约 2 倍,而且,在该实验的随后阶段一直保持这一效果。上述结果如图 6 所示。

#### 比较例 2

通过腹膜内给药给小鼠施用 1ml 含有  $10^9$  pfu Adex HST - 1 的培养基,并在首次给药后第 37 天再次给药。结果,在首次给药后约第 12 天,其血小板数约达 2 倍,然后在用药后第 35 天,血小板数降低并恢复到正常水平。在第二次施用 Adex HST - 1 后,其血小板数不再增加。上述结果如图 6 所示。

试验例 7 和比较例 2 的结果表明,可以反复使用例 1 中制备的基因

制剂，这一结果与反复使用不按本发明方法配制的腺病毒载体时所取得的结果不同，不按本发明配制之物不能反复服用的原因是由于中和抗体的出现。

5

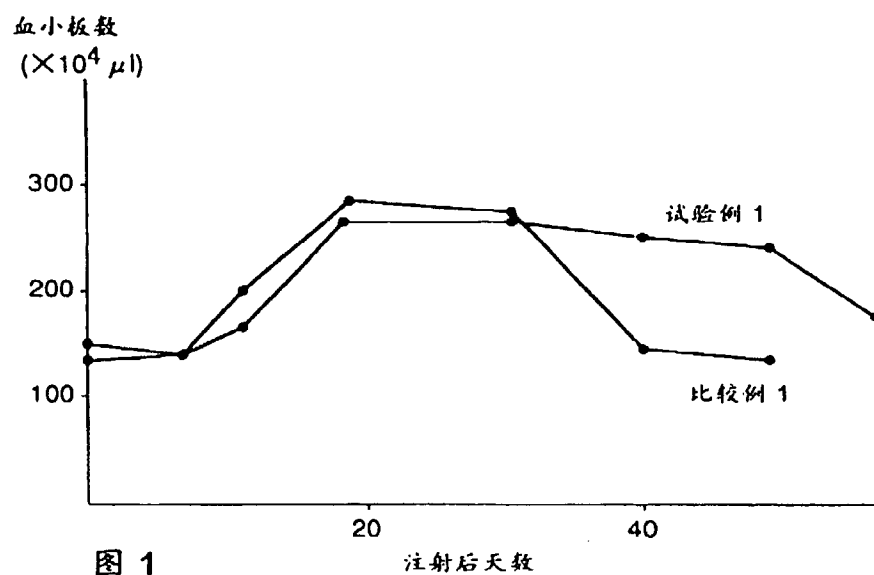


图 1

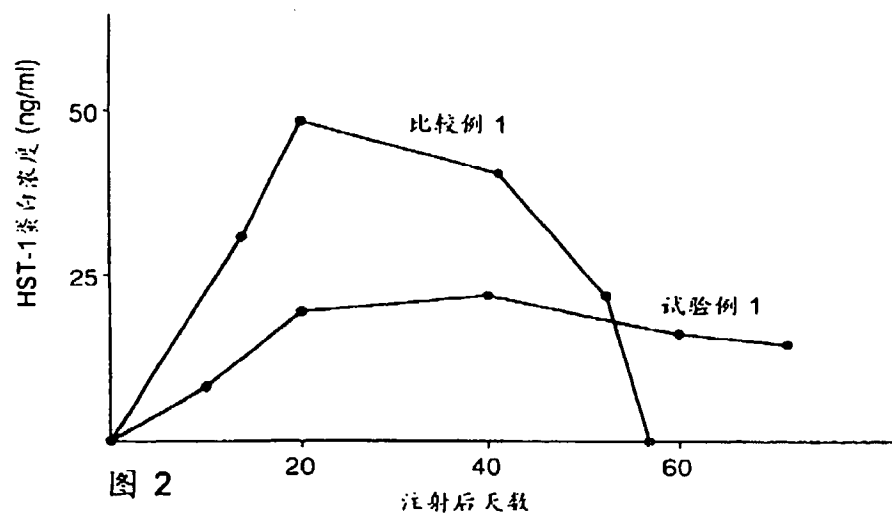
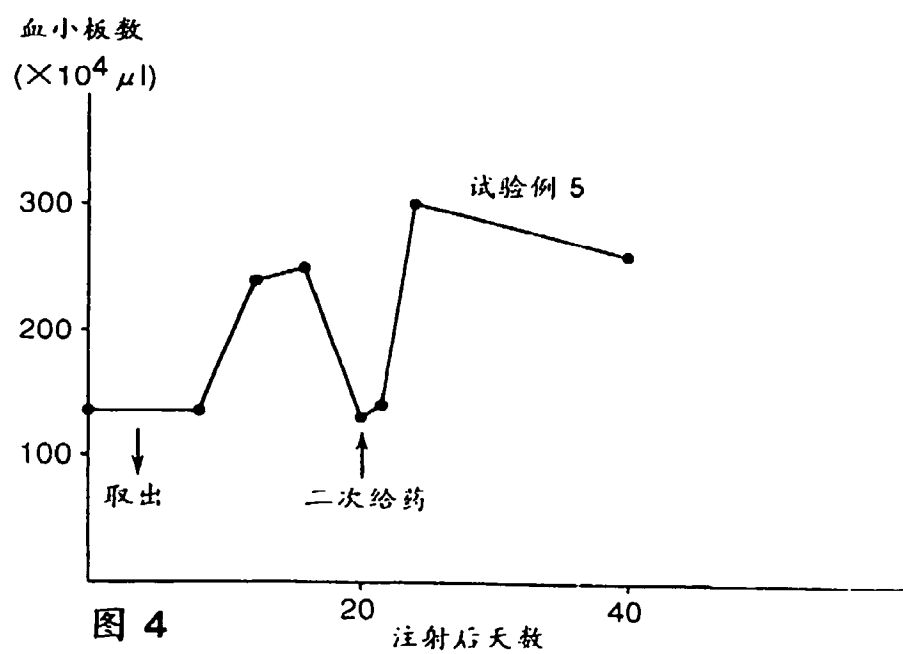
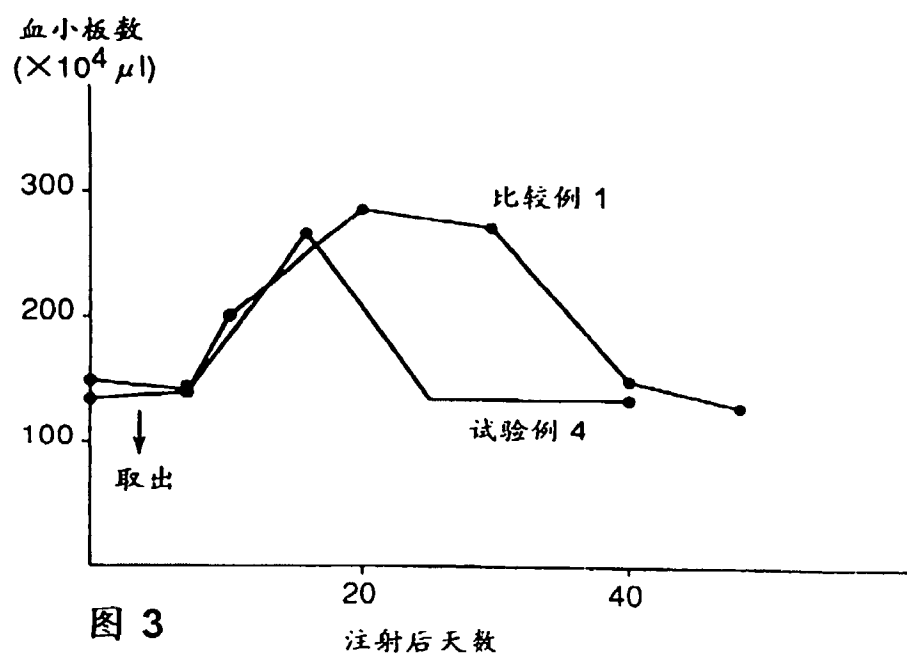
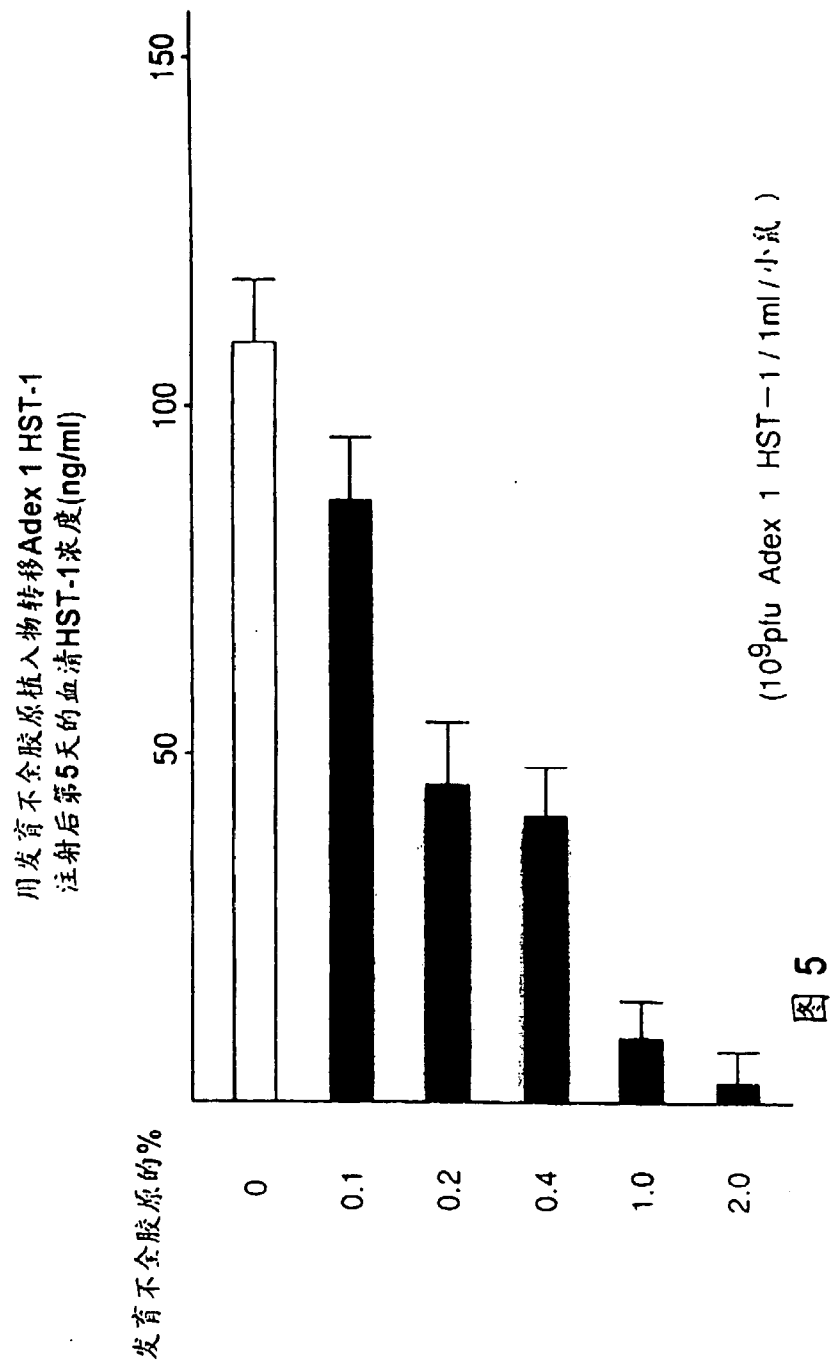


图 2







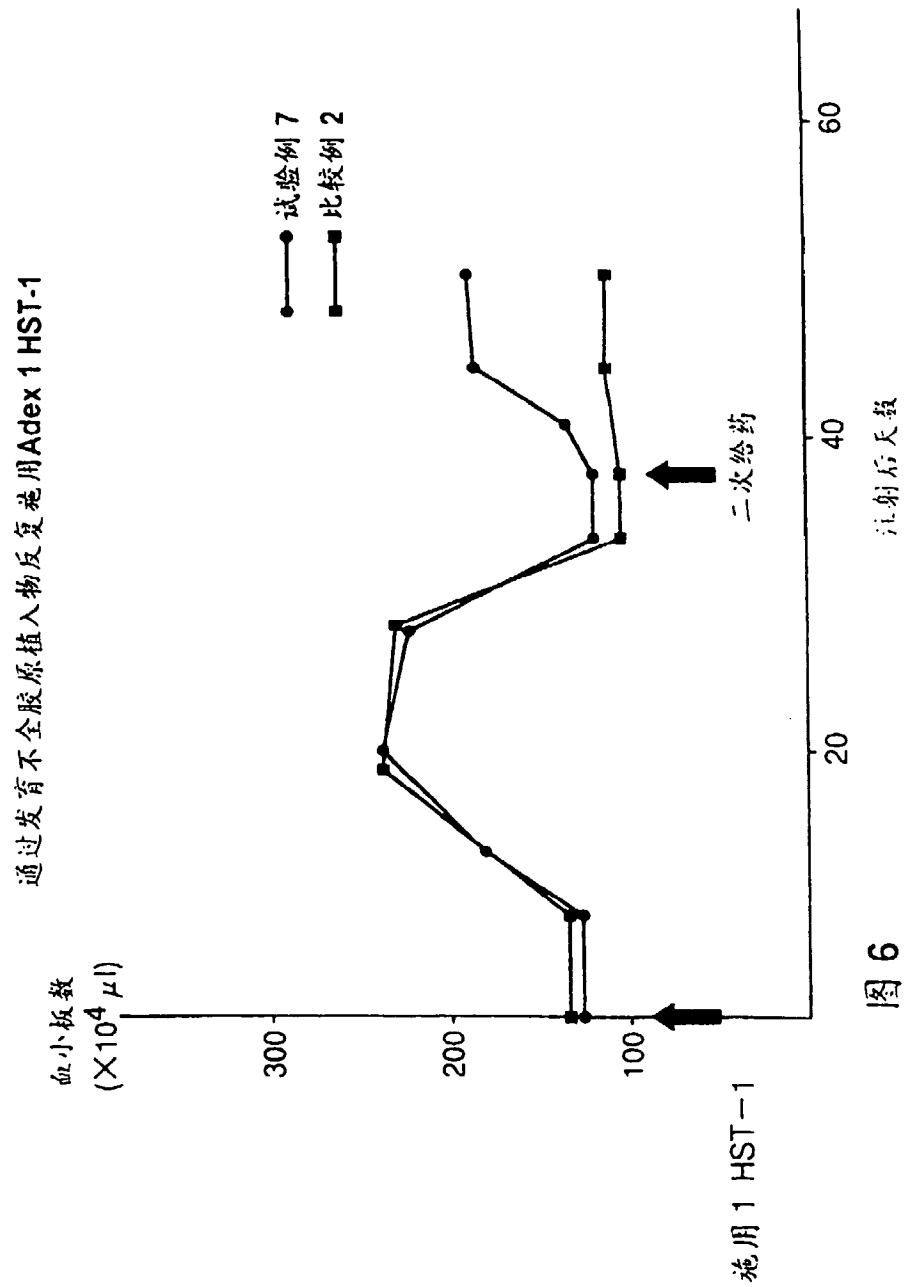


图 6